



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**

**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**LABORATÓRIO DE NEUROBIOLOGIA E HEMATOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR**

**EFEITOS DO HIPOTIREOIDISMO NO CRESCIMENTO  
NEURONAL, *IN VITRO***

**Juliana Klein Zucco**

**Florianópolis**

**2009**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

COLEGIADO DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EFEITOS DO HIPOTIREOIDISMO NO CRESCIMENTO NEURONAL,**

*IN VITRO*

**Trabalho de Conclusão do Curso**

(Estágio II – BIO 5156)

**ACADÊMICA:** Juliana Klein Zucco

Ciências Biológicas, 10ª fase

**ORIENTADORA:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andréa Gonçalves Trentin

Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética

Laboratório de Neurobiologia e Hematologia Celular e Molecular

**CO-ORIENTADORA:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cláudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar

Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética

Florianópolis, novembro de 2009.

---

Assinatura do (a) Acadêmico (a)

---

Assinatura do (a) Orientador (a)

"Falam muito da beleza da certeza como se ignorassem a beleza sutil da dúvida. Crer é muito monótono; a dúvida é apaixonante."

*Oscar Wilde*

"... A senhora me desculpe, mas no momento não tenho muita certeza. Quer dizer, eu sei quem eu era quando acordei hoje de manhã, mas já mudei uma porção de vezes desde que isso aconteceu. (...) Receio que não possa me explicar, Dona Lagarta, porque é justamente aí que está o problema. Posso explicar uma porção de coisas mas não posso explicar a mim mesma..."

*Lewis Carroll*

## **Agradecimentos**

Primeiramente, eu não posso deixar de agradecer a Prof.<sup>a</sup> Andréa Gonçalves Trentin, pois, afinal, se ela não tivesse me aceitado no laboratório – ou se tivesse me expulsado de lá – este trabalho nunca teria sido escrito. Portanto, eu agradeço todos os anos de paciência, todas as correções, orientações, todas as broncas (merecidas) e principalmente por ter me proporcionado a experiência de ter trabalhado no laboratório, já que foram anos de muito amadurecimento e muito aprendizado. Da mesma forma, agradeço à minha banca pela disponibilidade de tempo e a paciência com meus desacertos e pelas sugestões construtivas que certamente estão por vir. Muito obrigada!

Agradeço também à Cláudia, minha co-orientadora e mãe científica, por ter estado sempre disponível para discutir simplesmente tudo, desde questões do laboratório até conversas de bar. Agradeço pelo apoio integral e principalmente por ter permitido que eu participasse da sua pesquisa, que é simplesmente apaixonante (não existem células mais lindas que os astrócitos, fato!). Sou imensamente grata por sua valiosa orientação, em especial pelos “puxões de orelha” em razão dos meus muitos tropeços. Minha especial gratidão, por ter sido além de tudo uma amiga em todo esse tempo. Não posso deixar de agradecer também ao Lúcio, por nunca me deixar sem comida nos churrascos, já que sempre preparava muita coisa boa e vegetariana pra mim! Muito obrigada!

Não posso deixar de agradecer, ainda, de forma especial, o restante do falecido grupo T<sub>3</sub>, Gabriela e Ricardinho, por terem me ajudado com as culturas, experimentos e com os animais. Não teria sido nada fácil fazer tudo isso sem vocês!

Agradeço também ao povo do laboratório, citando-os em ordem alfabética para não gerar discórdia: ao Aloísio, por ser um exemplo de vida; à Bi, que me fez rir muito quando jogou álcool 70 no próprio rosto e que brigou comigo injustamente no seminário de paleontologia; à Bruna, semeadora da discórdia mor e companheira de bancada; à Bia, pela recepção maravilhosa no seu casamento e pela paciência para ouvir minhas histórias medonhas; à Denise,

que quer me deixar louca dizendo que não estava no laboratório em um dia que eu sei que ela estava; ao Diego, pelo esforço em contar piadas e divertir o povo, embora infelizmente as piadas nem sempre fossem muito engraçadas; à Fernanda, que briga comigo sempre por causa da minha bolsa; à Meline, que é a única pessoa que consegue ocupar mais espaço na bancada que a Talita; ao Raul, pelo serviço de atendimento à reforma ortográfica da língua portuguesa; à Sara, pelas piadas que não deveriam ter sido contadas às crianças; à Suelen, por emprestar seu caderno para que eu pudesse tirar xerox, até que ela própria o tenha abolido. Assim, de amiga nerd passou para amiga que derruba ependorffs e que me proporciona muito divertimento enquanto eu passo a festa toda segurando o cabelo dela no banheiro; à Talita, que, apesar de nunca ter levado bolo de cappuccino, me divertiu muito com o desfile de seu guarda-roupa fashion, que inclui o casaco GFP e a blusa que faz com que ela pareça nua e pelas histórias da infância dela que viram comunidades. Além disso, ela é também muito importante para o futuro do planeta, alertando às pessoas acerca da necessidade da utilização de apenas “Z” folhas para secar as mãos. Desrespeitando a ordem alfabética motivo, agradeço também ao New, por ter me entendido e sacrificado os animais por mim, por me ajudar nas culturas, nos experimentos, a fotografar minhas células, por ter me feito rir todos os dias, por ficar fedido comigo limpando o biotério, e por ir às 10 da noite pro laboratório colocar Brdu comigo em um experimento que não deu certo. E mais que isso, por ser meu amigo e meu homem, e alguém que eu amo mesmo tendo destruído a flora local em diversas ocasiões e sendo um ruivo sem alma. Não posso esquecer também dos que já saíram do lab., a Bika, amiga de conversas caóticas do msn que só têm sentido para nós duas, que eu *atóron* demais simplesmente por ser uma pessoa única e por me chocar e me fazer rir todos os dias; ao Bruno, que corrigiu meu projeto e que tem uma foto no orkut que me dá medo; à Cissa, em quem eu sempre posso confiar e conversar sobre tudo; ao Garcez, que gosta muito de melão e do New; e ao Gustavo, que me ajudou quando o meu piercing tinha inflamado.

Agradeço e peço desculpas aos amigos de biologia 05.1, pois estive muitas vezes ausente nos eventos, mas isso nunca significou descaso com eles, pelo contrário, vocês todos são muito

importantes pra mim. Eu nunca vou esquecê-los. Não citarei nomes, vocês sabem de quem estou falando.

Agradeço também aos grandes mestres que tive ao longo do curso de biologia, à Margherita, que me fez amar biologia celular, ao Paulo Hoffman, Paulo Simões, Ademir, Fiúza, Risoleta, Carla Tasca, Aguinaldo, Dani e Eduardo Soriano.

Agradeço aos amigos, que, mesmo sem contribuírem diretamente para o trabalho, me deram muito apoio psicológico e representaram um oásis em meio ao caos universitário, aos amigos do Catarinense e da vida. Agradeço também aos amigos distantes, nos quais posso confiar sempre, mesmo que “a geografia não nos favoreça”, como diz o Jean. Muito obrigada pela companhia e por terem sido a minha família no Canadá: Bruna, Sammy, Jacke, Thi, Mari, Natasha, Vini, Lee, Thomas, Ahmed e todo o pessoal que estudou comigo na LSC, pelas conversas que me ensinaram não só inglês, mas que foram também uma aula de cultura que mudou completamente a minha forma de ver as coisas. Thank you, eh!

Agradeço à minha família por ter sido meu suporte emocional (e financeiro) em todo meu caminho, por ter comemorado todas as minhas vitórias e por ter oferecido o ombro em todas as minhas derrotas, por ter sido meu exemplo sempre. Agradeço também aos meus padrinhos e às minhas quase primas Mari e Lelê, por estarem presentes desde antes de eu sair da maternidade até hoje. Muito obrigada!

E eu não posso, de forma nenhuma, deixar de agradecer ao Luis, mesmo que não tenha participado diretamente desses últimos passos da minha caminhada. Digo isso porque eu seria uma pessoa completamente diferente se, há oito anos, ele não tivesse entrado na minha vida. E foi ele quem durante todo esse tempo foi o meu ar, o meu chão e a minha paz. Foi ele quem ouviu todas as minhas lamúrias, quem sonhou comigo e sempre fez o possível e o impossível para me deixar feliz. Infelizmente o tempo foi muito cruel com os nossos planejamentos, mas nenhum tempo do mundo pode apagar o passado. Te amo!

## Resumo

Astrócitos são células que desempenham funções chave para o funcionamento do sistema nervoso central (SNC), atuando na manutenção da homeostase do microambiente neural, influenciando a migração celular, a captação e liberação de neurotransmissores, a concentração iônica do tecido nervoso e a estabilidade da barreira hematoencefálica. Os astrócitos apresentam ainda atividade de regulação da concentração extracelular de íons, além de participarem do metabolismo da glicose e sintetizarem e liberarem diversos fatores neurotróficos. Adicionalmente, os astrócitos são os principais transportadores da tiroxina do sangue e, sendo responsáveis pela sua conversão a  $T_3$ , fornecem aos tecidos nervosos o hormônio em sua forma ativa. A falta deste hormônio durante o primeiro trimestre de vida pós-natal em humanos resulta em cretinismo, síndrome caracterizada por retardo mental severo e, em modelo de rato, promove anormalidades morfológicas irreversíveis no cérebro. O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos do hipotireoidismo no crescimento de neurônios, cultivados em regime de co-cultura com astrócitos cerebelares provenientes de animais *Wistar* neonatos eutireóides ou hipotireóides. Observou-se uma visível diminuição no número de neurônios ao serem cultivados sobre astrócitos hipotireóides, que é ainda mais pronunciada quando os neurônios são hipotireóides. Na condição de astrócitos eutireóides, não houve diferença significativa no número de neurônios normais ou hipotireóides. Nos experimentos de tratamento com  $T_3$ , o aumento no número de neurônios foi maior nas concentrações de 1 nM e 10 nM de  $T_3$ , apesar da concentração de 0,5 nM também ter apresentado aumento significativo no crescimento neuronal em relação à condição controle. Quando os neurônios hipotireóides foram cultivados diretamente sobre poli-ornitina e mantidos com meio condicionado por astrócitos hipotireóides tratados com  $T_3$ , o número de neurônios encontrado foi muito inferior ao visto nas condições de culturas anteriores. Apesar disso, todas as células que receberam o meio condicionado por astrócitos que haviam sido tratados com  $T_3$  apresentaram crescimento neuronal significativo em relação à condição controle. Estes resultados demonstram que o crescimento neuronal depende diretamente da influência dos astrócitos, tanto pelo contato-célula quanto pela influência da matriz extracelular (MEC) e dos fatores solúveis secretados pelos neurônios, já que podem ser encontrados estudos na literatura que indicam que o microambiente gerado por astrócitos hipotireóides é mais pobre em MEC e fatores de crescimento que o gerado por astrócitos normais. Portanto, conclui-se que a melhor condição para o desenvolvimento neuronal envolve a secreção de fatores secretados pelos astrócitos em resposta ao hormônio tireoidiano além de contatos célula-célula.

## **Lista de abreviaturas**

DMEM: meio de Eagle modificado por Dulbecco

DNA: ácido desoxi-ribonucleico

FGF<sub>2</sub>: fator básico de crescimento de fibroblastos

FN: fibronectina

GFAP: proteína fibrilar acídica glial

GLAST: transportador de glutamato-aspartato

GLT-1: transportador de glutamato

IgG: Imunoglobulina

LN: laminina

MEC: matriz extracelular

MMI: metil-mercpto-imidazol-2-tiol

PBS: salina tamponada por fosfato

RNA: ácido ribonucléico

rT<sub>3</sub>: T<sub>3</sub> reverso

SBF: soro bovino fetal

SNC: sistema nervoso central

SNP: sistema nervoso periférico

T<sub>2</sub>: diiodotironina

T<sub>3</sub>: triiodo-L-tironina



T<sub>4</sub>: tiroxina

TRE: elemento de resposta ao hormônio da tireóide

TRs: receptor do hormônio da tireóide

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Desenho esquemático representando as células que compõem o sistema nervoso central de vertebrados	3
<b>Figura 2.</b> Esquema representativo das funções dos astrócitos	6
<b>Figura 3.</b> Esquema representativo das enzimas desiodases	8
<b>Figura 4.</b> Fotografia representativa de imunofluorescência para $\beta$ -tubulina III em co-culturas astrócitos-neurônios	16
<b>Figura 5.</b> Representação gráfica do número de células positivamente marcadas para $\beta$ -tubulina III em co-culturas astrócitos-neurônios	17
<b>Figura 6.</b> Fotografias representativas das imunofluorescências para $\beta$ -tubulina III em co-culturas de neurônios hipotireóides sobre astrócitos hipotireóides tratados com $T_3$ em três concentrações distintas (0,5, 1 e 10 nM)	19
<b>Figura 7.</b> Representação gráfica do número de células marcadas positivamente para $\beta$ -tubulina III em co-culturas de neurônios hipotireóides sobre astrócitos hipotireóides tratados com $T_3$ em três diferentes concentrações (0,5, 1 e 10 nM)	19
<b>Figura 8.</b> Fotografias representativas das imunocitoquímicas para $\beta$ -tubulina III realizadas em culturas de neurônios incubados com meio condicionado por astrócitos hipotireóides tratados com $T_3$	21
<b>Figura 9.</b> Representação gráfica do número de células marcadas positivamente para $\beta$ -tubulina III em culturas de neurônios hipotireóides mantidos durante 24 horas com meio condicionado por astrócitos hipotireóides, tratados com o hormônio $T_3$ nas concentrações de 0,5, 1 e 10 nM por cinco dias	21

## Sumário

1. Introdução	1
1.1 As células do sistema nervoso de vertebrados	1
1.2 O papel dos astrócitos no sistema nervoso central	3
1.3 O hormônio da tireóide	6
2. Objetivos	11
2.1 Objetivo geral	11
2.2 Objetivos específicos	11
3. Materiais e Métodos	12
3.1 Animais	12
3.2 Cultura primária de astrócitos cerebelares	12
3.3 Preparo de SBF depletado de $T_3$	13
3.4 Co-culturas astrócitos/neurônios	13
3.5 Tratamento com $T_3$	14
3.6 Culturas de neurônios hipotireóides com meio condicionado de astrócitos hipotireóides tratados com $T_3$	14
3.7 Imunocitoquímica para $\beta$ -tubulina III	14
3.8 Análise estatística	15
4. Resultados	16
4.1 Culturas de neurônios normais e hipotireóides sobre culturas de astrócitos normais e hipotireóides	16
4.2 Culturas de neurônios hipotireóides sobre astrócitos hipotireóides tratados com $T_3$	18
4.3 Culturas primárias de neurônios cultivados com meio condicionado por astrócitos hipotireóides tratados com $T_3$	20
5. Discussão	22
6. Conclusões	27
7. Referências	28

# 1. Introdução

## 1.1 - As células do sistema nervoso de vertebrados

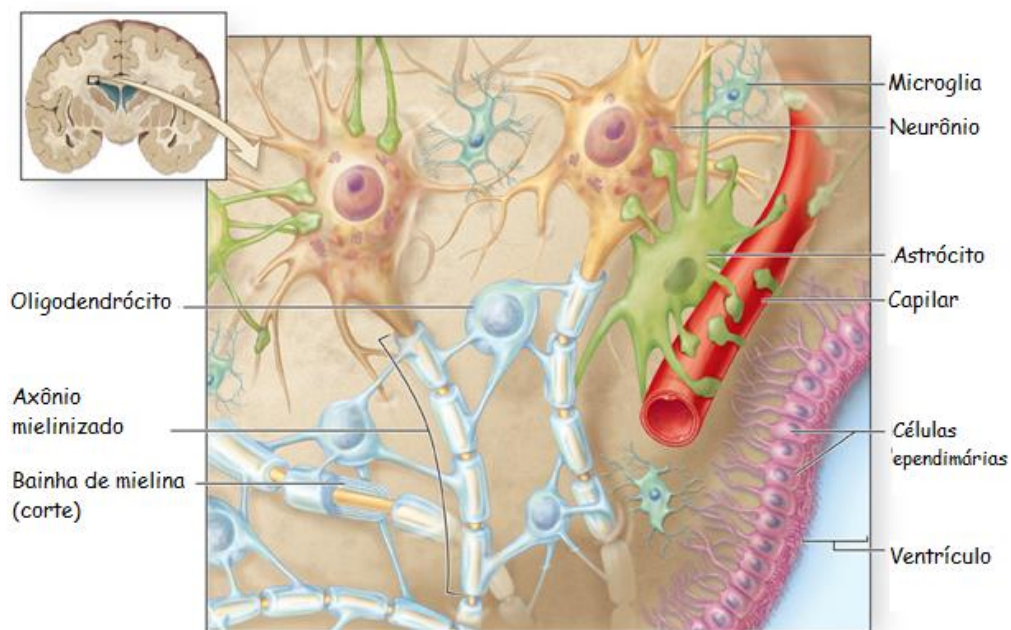
As células que compõem o sistema nervoso de vertebrados são os neurônios e as células da glia (Figura 1). Neurônios são células altamente polarizadas, que são responsáveis pela transmissão de impulsos elétricos, através de modificações do potencial elétrico de membrana (Guyton & Hall, 2002).

A glia é classificada em endimócitos, a microglia e a macroglia. As células endimárias são responsáveis pelo revestimento interno das cavidades do sistema nervoso central (SNC), estando em contato com o líquido cefalorraquidiano. Estas células derivam do revestimento interno do tubo neural embrionário e se mantêm em arranjo epitelial, enquanto as demais células daí originadas se diferenciam em neurônios e em células da glia (Gilberts, 2006).

A microglia e a macroglia correspondem a 50% da massa cerebral em vertebrados (Laming *et al.*, 2000), sendo que a primeira tem propriedade de proteção ao tecido nervoso contra danos e infecções, respondendo a danos, fagocitando restos celulares e participando de respostas inflamatórias. Em contraste com as células macrogliais, as quais derivam de precursores ectodermiais, as células da microglia derivam embriologicamente de monócitos na medula óssea. Além da função clássica de defesa do SNC, atualmente acredita-se que a microglia pode inclusive responder a impulsos nervosos e a interações neuroimunológicas, como, por exemplo, em condições de dor crônica (revisado em Fields & Grahnan, 2002).

A macroglia é composta pelos oligodendrócitos e pelos astrócitos (Figura 1). Oligodendrócitos são células formadoras de mielina no SNC, semelhantes às células de Schwann no sistema nervoso periférico. Ambas atuam englobando os processos axônicos e formando camadas, interrompidas pelos nódulos de Ranvier (Laming *et al.*, 2000).

Os astrócitos são células que desempenham funções consideradas chave para o funcionamento do SNC, com papel fundamental na manutenção da homeostase do microambiente neural. Desta forma, os astrócitos podem influenciar a migração celular, a captação e liberação de neurotransmissores, a concentração iônica do tecido nervoso e a estabilidade da barreira hematoencefálica. Além disso, os astrócitos atuam na eliminação de substâncias tóxicas criadas no SNC e estão envolvidos em uma variedade de desordens neurodegenerativas (Bignami & Dahl, 1994; Morte *et al.*, 2004).



**Figura 1.** Desenho esquemático representando as células que compõem o sistema nervoso central de vertebrados. Adaptado de Rienstra, 2006.

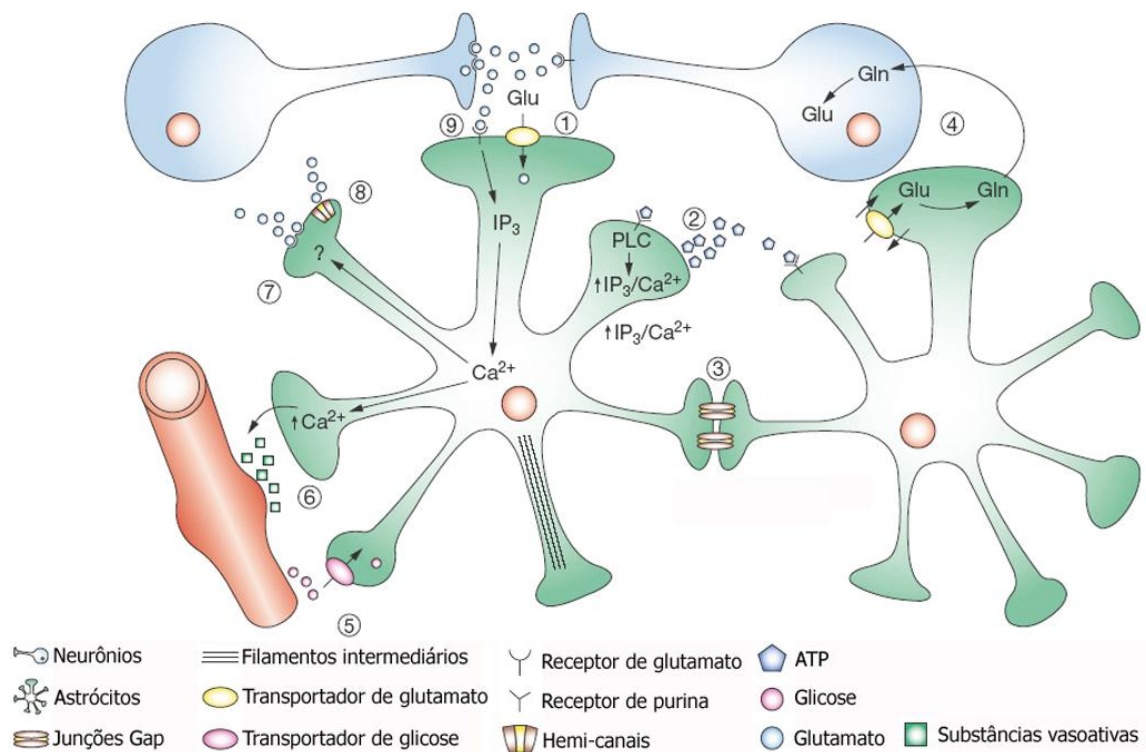
## 1.2 - O papel dos astrócitos no sistema nervoso central

Os astrócitos constituem as maiores e mais numerosas células gliais nos mamíferos, apresentando muitos prolongamentos e núcleo esférico central, excedendo o número de neurônios na proporção de 10:1. São divididos em protoplasmáticos (tipo I), que possuem prolongamentos curtos, sendo encontrados apenas na substância cinzenta; e em astrócitos fibrosos (tipo II), presentes na substância branca e caracterizados por apresentar prolongamentos longos (Sallis, 2005). Os astrócitos caracterizam-se pela presença de prolongamentos com filamentos intermediários (fibrilas gliais), cujo componente principal é a proteína glial fibrilar acídica glial (GFAP) e a vimentina, que servem como meio de identificação desse tipo celular em estudos *in situ* e *in vitro* (Montgomery, 1994). Alguns astrócitos podem apresentar formas especializadas, o que inclui a glia de Bergmann no córtex cerebelar, as células de Muller na retina, pituicitos na neurohipófise e tanicitos no terceiro ventrículo (Garcia-segura *et al.*, 1996; Fields & Steven-Grahan, 2002). Os astrócitos podem fazer contato com a parede endotelial dos vasos sanguíneos através de dilatações das regiões terminais dos seus prolongamentos, chamados pés vasculares. Além disso, formam uma interface com o plexo coróide, regulando assim as trocas iônicas entre o líquido cefalorraquidiano, o plasma e o tecido nervoso (Laming *et al.*, 2000). A astroglia está também implicada na fisiologia dos nódulos de Ranvier, devido a seus processos perinodais que estão em contato íntimo com a membrana dos axônios (Waxman & Black, 1984).

Os astrócitos apresentam ainda atividade de regulação da concentração extracelular de íons como potássio e cálcio, que funcionam como sinalizadores entre as células (Laming *et al.*, 2000). Durante o desenvolvimento do SNC os astrócitos

participam da orientação na migração neuronal, da modulação de sinapses excitatórias e inibitórias, da regulação da sinaptogênese, do processamento da informação (Ransom *et al.*, 2003) e da regulação da expressão de proteínas de heparan sulfato (sindecanas) no cerebelo (Mendes de Aguiar *et al.* (b), 2008). Através do espessamento dos feixes de filamentos gliais, os astrócitos participam da reparação do tecido nervoso (Bondan *et al.*, 2003; Montgomery, 1994), além de servirem de suporte mecânico para os oligodendrócitos durante a mielinização e degradação da mielina extracelular (Raff, 1989; Peters *et al.*, 1991; Michael & Norenberg, 1994; Montgomery, 1994; Summers *et al.*, 1995). Outra função astrocitária que se destaca é a participação no metabolismo da glicose, uma vez que nestas células ocorre a conversão da glicose para lactato, que é liberado no espaço extracelular e utilizado como substrato metabólico pelos neurônios (Tsacopoulos & Magestreti, 1996). Devido à presença de junções de comunicação, os astrócitos formam um sincício funcional no qual mudanças na concentração de íons e moléculas solúveis são rapidamente equilibradas (Sallis, 2005).

Os astrócitos também sintetizam e liberam diversos fatores neurotróficos, como fatores de crescimento peptídicos, como o fator de crescimento de nervo (NGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator neurotrófico ciliar (CNTF), neurotransmissores (como o glutamato, Figura 2), moléculas de adesão celular (N-CAM) (Dow & Wang, 1998) e proteínas de matriz extracelular (como laminina e fibronectina) (Trentin *et al.*, 2003). Com relação ao glutamato, o astrócito age na captação desta molécula no espaço extracelular, protegendo assim os neurônios contra a excessiva estimulação, que pode levar à excitotoxicidade e morte celular (Mendes de Aguiar *et al.* (a), 2008).



**Figura 2.** Esquema representativo das funções dos astrócitos. (1) Captação de glutamato na fenda sináptica via transportador de glutamato; (2) interação entre astrócitos via ATP; (3) comunicação entre astrócitos, via junções *gap*; (4) liberação de glutamina; (5) transporte de glicose; (6) liberação de substâncias vasoativas; (7) liberação de glutamato; (8) liberação de glutamato pelos hemi-canaís; (9) captação do glutamato. Adaptado de Maragakis e Rothstein (2006).

Adicionalmente, os astrócitos apresentam papel central no metabolismo dos hormônios tireoidianos no cérebro, sendo os principais transportadores da tiroxina do sangue e sendo responsáveis pela sua conversão a 3, 5, 3' -triiodotironina, fornecendo aos tecidos nervosos o hormônio em sua forma ativa (Anderson *et al*, 2001; Trentin 2006).

Desta forma, é importante ressaltar que as funções cerebrais dependem de uma íntima sinalização entre neurônios e células da glia, que se influenciam mutuamente durante a diferenciação celular, desenvolvimento e metabolismo. Os sinais entre



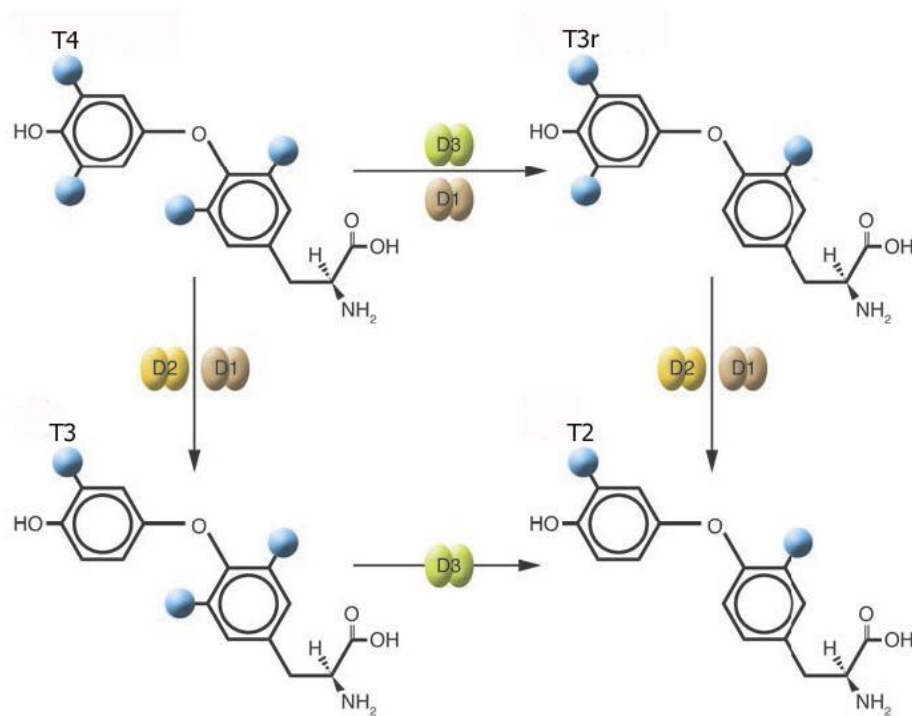
neurônios e glia incluem fluxos de íons, neurotransmissores, moléculas de adesão celular e moléculas de sinalização liberadas nas regiões sinápticas e não sinápticas dos neurônios. Pela liberação de neurotransmissores e outras moléculas de sinalização molecular, a glia pode afetar a excitabilidade neuronal e a transmissão sináptica, coordenando a atividade de uma rede inteira de neurônios (Fields & Steven-Grahan, 2002).

### **1.3. - O hormônio da tireóide**

O principal produto secretado pela glândula tireóide é a tiroxina –  $T_4$ , considerado um pró-hormônio. Através da desiodação do anel externo, o  $T_4$  é convertido em  $T_3$ , evento regulado pela ação de enzimas desiodases, as quais regulam a distribuição local do  $T_3$  para seus receptores nucleares (Figura 3). No encéfalo, o suprimento de  $T_3$  depende da captação celular deste hormônio ou da desiodação intracelular de  $T_4$  pela desiodase tipo II. A desiodase do tipo II catalisa a monodesiodação do  $T_4$  a  $T_3$  e do  $rT_3$  ( $T_3$  reverso) para  $T_2$  (diiodotironina). A desiodase do tipo III catalisa a desiodação do  $T_4$  em  $rT_3$  e do  $T_3$  em  $T_2$ . Como  $rT_3$  e  $T_2$  têm pouca atividade biológica, o papel mais importante dessa enzima é o de regulação da concentração intracelular de  $T_3$ , sendo uma enzima essencial na maturação e função cerebral (revisado em Trentin, 2006).

A atividade das desiodases pode alterar substancialmente a sinalização do hormônio tireoidiano em uma célula (Bianco *et al.*, 2002). Quando a concentração total de  $T_4$  excede duas vezes a de  $T_3$ , o  $T_4$  é ligado a proteínas carreadoras e a concentração livre de  $T_4$  e  $T_3$  se torna similar novamente (Bianco & Kim, 2006).

O hormônio da tireóide é citado como um dos grandes reguladores do metabolismo de mamíferos adultos (Guyton & Hall, 2002). Além da regulação da atividade metabólica, o  $T_3$  age como fator de transcrição, regulando positivamente a ocitocina, a proteína básica mielínica (BMP), NGF, FGF, a fibronectina e um grande número de outras moléculas, podendo regular de maneira negativa moléculas como hormônio de crescimento humano (GH), proteína G-  $\beta$  e o receptor para fator de crescimento epidermal (EGF) (Jameson & Degroot, 1994).



**Figura 3.** Esquema representativo das enzimas desiodases. D3 e D1 catalisam a desiodação do anel interno, convertendo  $T_4$  em  $T_{3r}$  e  $T_3$  em  $T_2$ . D2 e D1 catalisam a desiodação do anel externo, convertendo  $T_4$  em  $T_3$  e  $T_{3r}$  em  $T_2$ .  $T_4$ : tiroxina  $T_3$ : triiodotironina;  $T_2$ : diiodotironina;  $T_{3r}$ : triiodotironina reversa. As bolas azuis representam a molécula de iodo. Adaptado de Bianco e Kim (2006).

No adulto, o hormônio da tireóide chega ao cérebro por duas rotas. A predominante é via barreira hematoencefálica, envolvendo transporte direto através do

epitélio capilar até as células nervosas; e a segunda e menos significativa é via plexo coróide-fluído cerebrospinal (Ahmed *et al.*, 2007).

A ausência do hormônio da tireóide durante o primeiro trimestre de vida em humanos resulta em cretinismo, síndrome caracterizada por retardo mental severo. Em modelo de rato, a deficiência em  $T_3$  promove anormalidades morfológicas irreversíveis no cérebro (revisado em Farwell *et al.*, 2006), como redução na densidade dendrítica, migração e proliferação de neurônios anormais e malformações (Ahmed *et al.*, 2007). No cerebelo, a falta do hormônio da tireóide durante a fase de desenvolvimento pós-natal promove defeitos na migração e aumento de morte das células granulares e na arborização das células de Purkinje (revisado em Bernal *et al.*, 2007). Apesar disso, a reposição de  $T_3$  durante as primeiras duas semanas de vida permite ao cerebelo a maturação eutireóidea do mesmo, por restaurar a migração das células granulares e a arborização das células de Purkinje (Farwell *et al.*, 2005), já que o hormônio age mais tardiamente no desenvolvimento dos roedores, no final do período pré e peri natal (Ahmed *et al.*, 2007).

O feto inicia a síntese do hormônio da tireóide a partir da metade do período gestacional em humanos e do dia embrionário E17.5 e E18 em ratos (o período gestacional em ratos corresponde a 21 dias). Assim, o cérebro fetal é exposto ao  $T_3$  produzido pela mãe no início do desenvolvimento, sendo esta a única fonte deste hormônio durante este período (revisado em Ahmed *et al.*, 2007).

Considerando as características do desenvolvimento de roedores e sua relação com os hormônios tireoidianos, pode-se ressaltar o cerebelo como importante modelo para o entendimento dos eventos tardios do hipotireoidismo congênito no desenvolvimento humano. Em humanos o desenvolvimento do cerebelo começa durante

o fim do segundo trimestre de gestação, enquanto em ratos começa no 13º dia embrionário (E13). Progenitores neuronais migram dorsalmente, guiados pela matriz extracelular (MEC) (Porcinatto, 2006), a partir do lábio rômico para formar os núcleos cerebelares primordiais (Wingate, 2001). A diferenciação destes progenitores ocorre principalmente entre o terceiro trimestre fetal e o sexto mês de vida em humanos. Em ratos, esta diferenciação celular ocorre durante o período pós-natal, entre o nascimento até a segunda semana (P0 – P14) (Trentin *et al.*, 2003).

Os efeitos do hormônio da tireóide no desenvolvimento do SNC são bem conhecidos, porém não totalmente esclarecidos. Desta forma, trabalhos que busquem o entendimento a respeito da forma como o hormônio da tireóide influencia no crescimento das células deste sistema são fundamentais. Os dados na literatura sugerem que o T<sub>3</sub> promove a formação de um microambiente mais adequado ao desenvolvimento e sobrevivência neuronal e neuritogênese. Assim, nesse trabalho será avaliada a influência do hipotireoidismo no crescimento neuronal mediado por astrócitos cerebelares provenientes de animais normais ou hipotireóides, bem como os efeitos do tratamento de astrócitos hipotireóides com T<sub>3</sub> neste processo.

## **2. Objetivos**

### **2.1 - Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos do hipotireoidismo no crescimento de neurônios, cultivados em regime de co-cultura com astrócitos cerebelares normais ou hipotireóideos.

### **2.2 - Objetivos Específicos**

- Determinar o crescimento no número de neurônios normais e hipotireóideos, quando cultivados sobre monocamadas de astrócitos provenientes de ratos neonatos normais e hipotireóideos;
- Verificar uma possível recuperação no crescimento de neurônios hipotireóideos após tratamento da monocamada de astrócitos hipotireóideos com T<sub>3</sub>;
- Observar os efeitos do meio condicionado de astrócitos hipotireóideos tratados com T<sub>3</sub> no crescimento de neurônios hipotireóideos, em cultura primária.

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1 – Animais**

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) neonatos P0-P3 para as culturas de astrócitos e P0 para as culturas de neurônios, normais e hipotireóides de ambos os sexos. Fêmeas prenhas foram fornecidas pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidas no biotério do Laboratório de Neurobiologia e Hematologia Celular e Molecular, seguindo as indicações do código de ética de utilização de animais para pesquisa (Protocolo 100/CEUA 2007), em ciclo de claro/escuro, com água e ração *ad libitum* até o nascimento dos filhotes. Para obtenção de filhotes hipotireóides, as fêmeas receberam MMI (metil-mercaptopimidazol-2-tiol a 0,02%, Sigma), adicionado à água durante os últimos 14 dias gestacionais (Mendes de Aguiar, 2008), que inibe a ação das desidases. Os filhotes foram sacrificados por decapitação com tesoura.

#### **3.2 - Cultura primária de astrócitos cerebelares**

Após a decapitação, os encéfalos foram colocados em placa de Petri com PBS glicose (0, 6%) e os cerebelos dissecados sob microscópio estereoscópico em fluxo laminar, tendo suas meninges retiradas completamente, para serem em seguida dissociados com pipeta Pasteur. Após centrifugação (5 minutos a 2.000RPM) o sobrenadante foi retirado e as células foram ressuspensas em meio de cultura DMEM-F12 (Gibco). As células foram quantificadas em câmara de Neubauer e plaqueadas em placas de cultura de 24 poços, na densidade de  $3 \times 10^5$  células por poço, previamente tratadas com solução de 1,5µg/mL poli-ornitina (Sigma). As células provenientes de animais normais foram mantidas em DMEM-F12 acrescido de 10% de soro bovino fetal (SBF, Gibco), enquanto as células provenientes de animais hipotireóides foram

mantidas em DMEM-F12 acrescido de 10% de SBF depletado de  $T_3$ . Em ambas as condições, as culturas foram mantidas em estufa úmida com 5% de  $CO_2$  a  $37^\circ C$ , com troca de meio a cada 3 ou 4 dias, até que atingissem a confluência, o que ocorria entre o décimo e o décimo quarto dia.

### **3.3 - Preparo de SBF depletado de $T_3$**

A depleção de  $T_3/T_4$  do SBF foi realizada por adsorção, com o uso da resina analítica por troca aniônica AG 2-X8. A ausência de  $T_3$  e  $T_4$  no SBF após a depleção dos hormônios foi confirmada por Rádio-Imuno-Ensaio (Lima *et al.*, 2001). A resina foi adicionada ao SBF e a solução foi mantida em agitação, no escuro a  $4^\circ C$ , por 6 horas. A seguir, o SBF foi mantido em repouso por aproximadamente 1 hora, no escuro, permitindo a decantação da resina, que foi descartada. O SBF foi então transferido para outro frasco contendo resina e novamente a solução foi mantida em agitação, no escuro a  $4^\circ C$ , desta vez por 12 horas. Após o período de decantação da resina, o SBF foi transferido para tubos de centrífuga de vidro e centrifugado por 20 minutos a 12.000 g, a  $4^\circ C$ . Em seguida, o SBF depletado de  $T_3/T_4$  foi adicionado ao DMEM/F12 ou estocado a  $-20^\circ C$ . (Mendes de Aguiar, 2008).

### **3.4 - Co-culturas astrócitos/neurônios**

As co-culturas foram realizadas quando as monocamadas astrocitárias atingiram a confluência. O procedimento para a obtenção dos neurônios foi o mesmo realizado para obter os astrócitos. Neurônios foram obtidos de animais normais e hipotireóides e plaqueados ( $1,5 \times 10^5$  células) tanto sobre astrócitos normais como sobre astrócitos hipotireóides e mantidos por 24 horas em estufa úmida a  $37^\circ C$  com 5% de  $CO_2$  com DMEM-F12 sem adição de soro bovino fetal ou hormônio.

### **3.5 - Tratamento com T<sub>3</sub>**

O tratamento com T<sub>3</sub> foi realizado assim que as culturas primárias de astrócitos hipotireóideos atingissem a confluência, da seguinte forma: nos três primeiros dias ocorreu troca diária do meio de cultura DMEM-F12 suplementado com T<sub>3</sub> (Sigma), nas concentrações de 0,5, 1 e 10 nM, seguido por uma pausa de dois dias sem troca de meio. No quinto dia de tratamento o meio foi removido e, após lavagem com PBS, foram plaqueados neurônios isolados a partir de cerebelos de animais hipotireóideos e adicionado meio de cultura fresco, sem SBF e sem T<sub>3</sub>. Estas co-culturas foram mantidas por 24 horas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, para serem em seguida fixadas e tratadas conforme o procedimento de imunocitoquímica descrito abaixo.

### **3.6 - Culturas de neurônios hipotireóideos com meio condicionado de astrócitos hipotireóideos tratados com T<sub>3</sub>**

Para este experimento, foi realizada a cultura primária de neurônios hipotireóideos sobre placas preparadas com solução de 1,5µg/mL poli-ornitina, os quais foram mantidos por 24 horas com o meio condicionado pelos astrócitos previamente tratados com T<sub>3</sub> nas concentrações de 0,5, 1, 5 e 10 nM, conforme já descrito anteriormente. Após este período, as culturas foram fixadas e submetidas à imunocitoquímica para β-tubulina III. É importante salientar que, para este experimento, foi plaqueado o mesmo número de neurônios (1,5 x 10<sup>5</sup> células) do que o utilizado para as co-culturas.

### **3.7-- Imunocitoquímica para β-tubulina III**

A imunocitoquímica foi realizada à temperatura ambiente, diretamente sobre as co-culturas fixadas com paraformaldeído 4% durante 30 minutos e em seguidas lavadas



três vezes com PBS. Inicialmente, as células foram permeabilizadas com solução de PBS contendo 0,25% de Triton X-100 (Sigma), por 20 minutos, para permitir ao anticorpo o acesso aos antígenos citoplasmáticos. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com 5% de SBF diluído em PBS, durante 30 minutos. As células foram novamente lavadas com PBS e incubadas por 12 horas, com o anticorpo monoclonal IgG de camundongo anti- $\beta$ -tubulina-III (1:400) (Sigma), em câmara úmida a 4°C. Após esse período, as células foram lavadas com PBS, seguindo-se a incubação com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo, conjugado à rodamina (Cy3, 1:2500) (Sigma) durante uma hora, à temperatura ambiente. Por fim, as células foram cobertas com glicerina (Merck) tamponada (pH 9,0), observadas ao microscópio epifluorescente invertido (Olympus IX71) e fotografadas através do sistema de captura de imagem (Olympus DP71).

### **3.8 - Análise estatística**

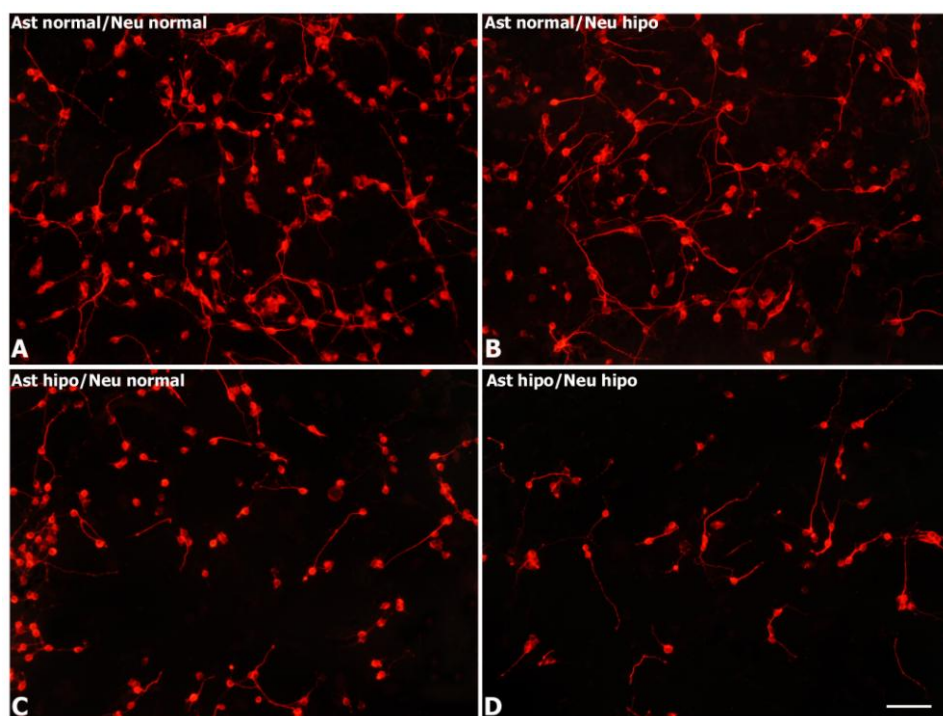
Nas co-culturas astrócitos-neurônios normais e hipotireóides, a análise estatística foi realizada pelo método ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni, onde foram analisadas duas variáveis (astrócito ou neurônio e normal ou hipotireóide). As co-culturas com curva de tratamento de T<sub>3</sub> e as culturas primárias de neurônios foram analisadas estatisticamente pelo método ANOVA de uma via, comparando-se as médias de cada grupo tratado em relação às médias de um grupo controle, seguido pelo teste de Newmann-Keuls, o qual compara todos os grupos entre si. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa *Graphpad Prism 4*.

## **4. Resultados**

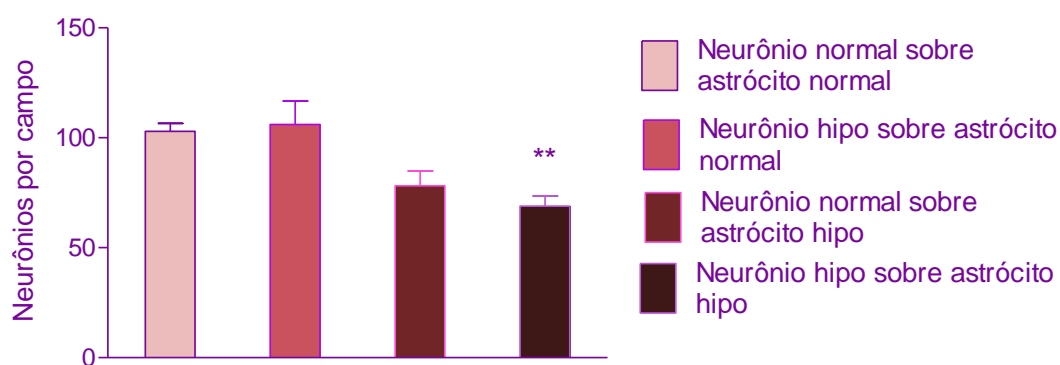
### **4.1 - Culturas de neurônios normais e hipotireóideos sobre culturas de astrócitos normais e hipotireóideos**

Neurônios provenientes de cerebelos tanto de animais hipotireóideos quanto de animais normais foram cultivados sobre uma monocamada formada por astrócitos normais e hipotireóideos, formando assim quatro tipos diferentes de co-culturas: neurônios normais sobre astrócitos normais, neurônios hipotireóideos sobre astrócitos normais, neurônios normais sobre astrócitos hipotireóideos e neurônios hipotireóideos sobre astrócitos também hipotireóideos.

As Figuras 4 e 5 demonstram uma visível diminuição no número de neurônios quando estes são cultivados sobre astrócitos hipotireóideos. Esta redução é ainda mais pronunciada quando os neurônios também apresentam esta deficiência. Na condição de astrócitos eutireóideos, não houve diferença significativa no número de neurônios normais ou hipotireóideos.



**Figura 4.** Fotografia representativa de imunofluorescência para  $\beta$ -tubulina III em co-culturas astrócitos-neurônios. (A) Neurônios normais sobre astrócitos normais; (B) Neurônios hipotireóideos sobre astrócitos normais; (C) Neurônios normais sobre astrócitos hipotireóideos; (D) Neurônios hipotireóideos sobre astrócitos hipotireóideos. Foram contados pelo menos 8 campos de cada condição, em três experimentos independentes realizados em duplicatas. Barra = 50  $\mu$ m.

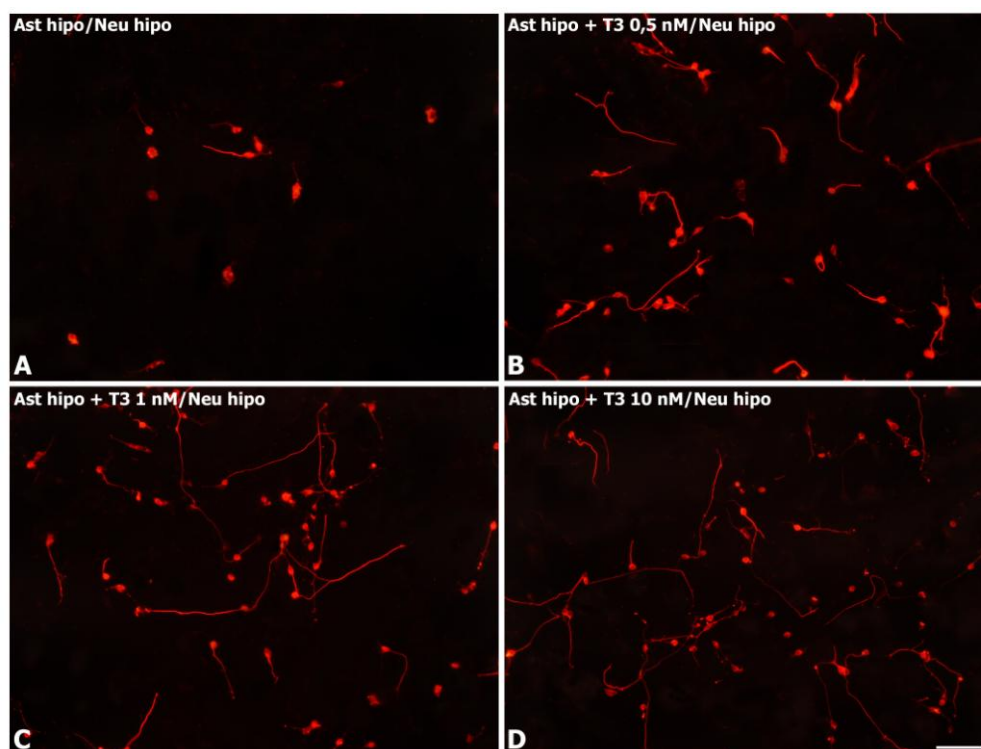


**Figura 5.** Representação gráfica do número de células positivamente marcadas para  $\beta$ -tubulina III em co-culturas astrócitos-neurônios. Os resultados representam a média do número de neurônios por campo  $\pm$  erro padrão de pelo menos oito campos contados de cada condição, em três experimentos independentes realizados em duplicata. \*\* $p < 0,01$ , em relação às culturas de neurônios sobre astrócitos normais, por ANOVA de duas seguido de teste de Bonferroni.

#### 4.2 - Culturas de neurônios hipotireóideos sobre astrócitos hipotireóideos tratados com T<sub>3</sub>

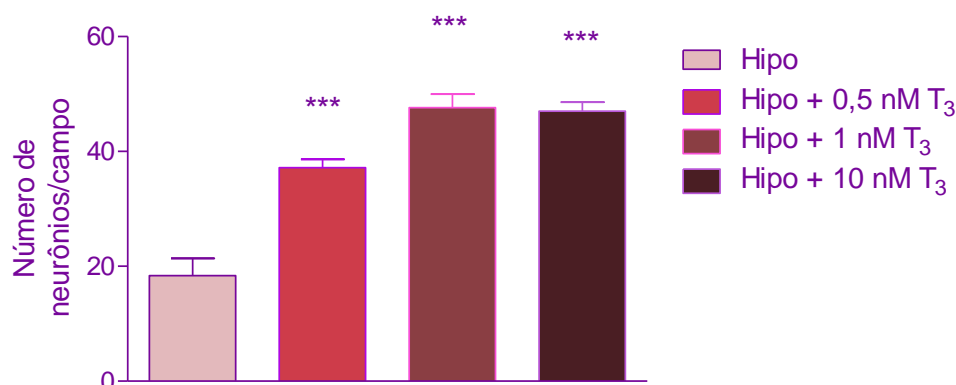
Culturas de astrócitos hipotireóideos foram tratadas T<sub>3</sub> nas concentrações de 0,5, 1 e 10 nM, conforme Materiais e Métodos. Neurônios hipotireóideos foram plaqueados sobre estes astrócitos e, após 24 horas, submetidos às análises.

Na Figuras 6 e 7, pode-se observar que o tratamento com T<sub>3</sub> exerceu um efeito dramático no crescimento neuronal. A Figura 7 demonstra que o aumento no número de neurônios foi significativo em todas as concentrações de tratamento com T<sub>3</sub>, em relação à condição controle, que não recebeu o hormônio.



**Figura 6.** Fotografias representativas das imunofluorescências para  $\beta$ -tubulina III em co-culturas de neurônios hipotireóideos sobre astrócitos hipotireóideos tratados com T<sub>3</sub> em três concentrações distintas (0,5, 1 e 10 nM). (A) Neurônios hipotireóideos sobre astrócitos hipotireóideos sem tratamento com T<sub>3</sub> (condição controle); (B) Neurônios hipotireóideos sobre astrócitos hipotireóideos com tratamento de 0,5

nM de  $T_3$ ; (C) neurônios hipotireóideos sobre astrócitos hipotireóideos com tratamento de 1nM de  $T_3$  e (D) neurônios hipotireóideos sobre astrócitos hipotireóideos com tratamento de 10 nM de  $T_3$ . Barra = 50  $\mu$ m.

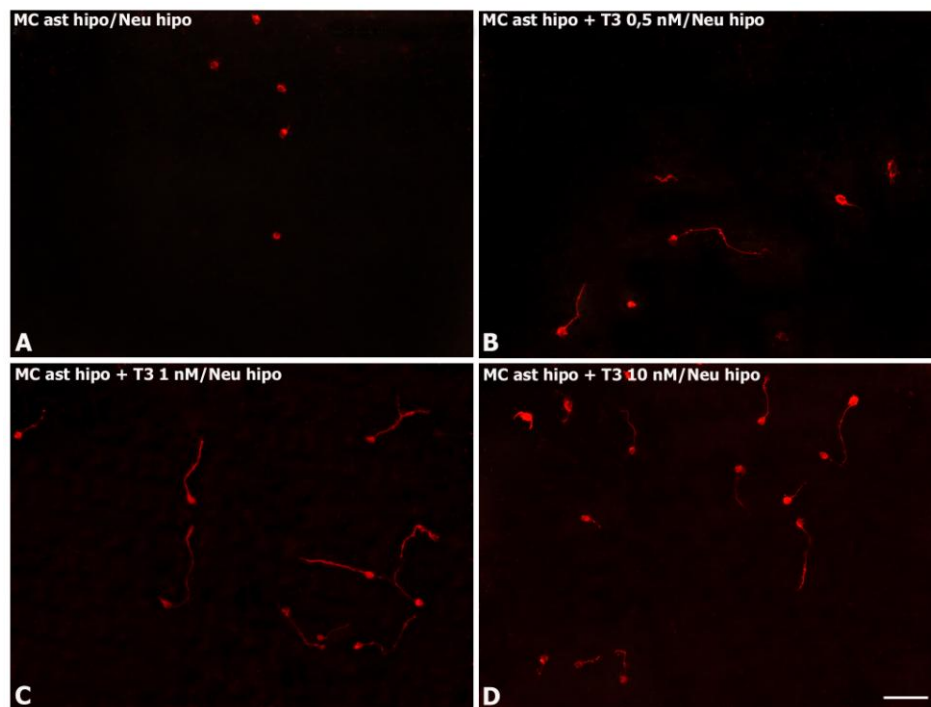


**Figura 7.** Representação gráfica do número de células marcadas positivamente para  $\beta$ -tubulina III em co-culturas de neurônios hipotireóideos sobre astrócitos hipotireóideos tratados com  $T_3$  em três diferentes concentrações (0,5, 1 e 10 nM). Os resultados representam a média do número de neurônios por campo  $\pm$  erro padrão de pelo menos oito campos contados de cada condição, em três experimentos independentes realizados em duplicata, por ANOVA de uma via seguido de teste de Newmann-Keuls. \*\*p < 0,001.

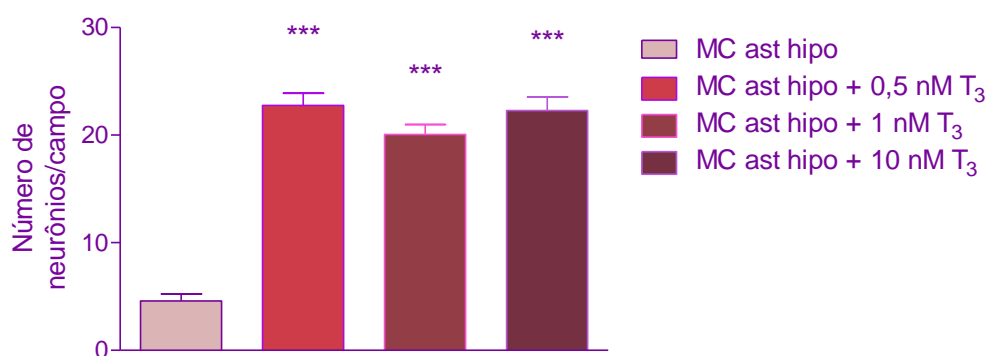
#### 4.3 - Culturas primárias de neurônios cultivados com meio condicionado por astrócitos hipotireóideos tratados com $T_3$

Para este experimento, neurônios provenientes de animais hipotireóideos foram cultivados em meio condicionado por astrócitos hipotireóideos tratados com diferentes concentrações de  $T_3$ , por 24 horas, conforme Materiais e Métodos. Como pode ser observado na Figura 8, nenhuma das condições foi eficiente no desenvolvimento neuronal, demonstrando que o papel de suporte desempenhado pelos astrócitos não se resume aos fatores secretados, já que o número de neurônios nestas culturas foi muito inferior ao que foi observado nas co-culturas, onde os astrócitos estavam presentes formando uma monocamada. Apesar disso, o papel dos fatores secretados pelos astrócitos não pode ser descartado, já que, como mostra a Figura 9, o crescimento

neuronal teve aumento significativo nas culturas que receberam meio condicionado de astrócitos tratados com  $T_3$ .



**Figura 8.** Fotografias representativas das imunocitoquímicas para  $\beta$ -tubulina III realizadas em culturas de neurônios incubados com meio condicionado por astrócitos hipotireóideos tratados com  $T_3$ . (A) Neurônios hipotireóideos mantidos com meio condicionado por astrócitos hipotireóideos; (B) Neurônios hipotireóideos mantidos com meio condicionado por astrócitos hipotireóideos tratados com 0,5 nM de  $T_3$ ; (C) Neurônios hipotireóideos mantidos com meio condicionado por astrócitos hipotireóideos tratados com 1 nM de  $T_3$  e (D) Neurônios hipotireóideos mantidos com meio condicionado por astrócitos hipotireóideos tratados com 10nM de  $T_3$ . Barra = 50  $\mu$ m.



**Figura 9.** Representação gráfica do número de células marcadas positivamente para  $\beta$ -tubulina III em culturas de neurônios hipotireóideos mantidos durante 24 horas com meio condicionado por astrócitos hipotireóideos, tratados com o hormônio  $T_3$  nas concentrações de 0,5, 1 e 10 nM por cinco dias. Os resultados representam a média do número de neurônios  $\pm$  erro padrão de pelo menos oito campos contados de cada condição, em três experimentos independentes realizados em duplicata. \*\*\* $p < 0,001$ , em relação às culturas com meio condicionado de astrócitos sem o tratamento com  $T_3$ , por ANOVA de uma via seguido de teste de Newmann-Keuls.

## 5. Discussão

Os efeitos do hormônio da tireóide,  $T_3$ , no desenvolvimento do SNC são bem documentados, regulando diversos aspectos da diferenciação astrocitária, o que implica diretamente no desenvolvimento neuronal. Neste trabalho, demonstramos que o hipotireoidismo promove menor crescimento neuronal e que o tratamento de astrócitos hipotireóides com  $T_3$  recupera o crescimento dos neurônios. Além disso, nossos resultados demonstram que o contato dos neurônios com os astrócitos é fundamental para o seu desenvolvimento, já que o meio condicionado por astrócitos hipotireóides tratados com  $T_3$  não foi eficiente no crescimento neuronal, em comparação às co-culturas.

No primeiro grupo de experimentos foi observado que a melhor condição de cultivo para neurônios foi sobre uma monocamada de astrócitos eutireóides, já que a abundância de neurônios diminuiu consideravelmente quando estes foram cultivados sobre astrócitos hipotireóides. Além disso, quando neurônios hipotireóides foram cultivados sobre astrócitos eutireóides, o número de neurônios manteve-se semelhante ao encontrado na condição que continha neurônios normais cultivados sobre astrócitos normais. Desta forma, pode-se perceber que o astrócito desempenha papel crucial na manutenção do crescimento neuronal, onde é fundamental que a glia apresente a condição eutireóidea para o crescimento normal do neurônio. Segundo Dezone *et al.* (2009), astrócitos normais de córtex de camundongos cultivados em meio de cultura depletado de  $T_3$  não apresentam diferença na taxa de crescimento, morfologia e viabilidade, mas quando estas culturas foram analisadas à sua matriz extracelular, foi percebida uma queda de 50% na fibronectina, enquanto a laminina se manteve em nível semelhante à condição controle, apesar de apresentar mudanças drásticas no seu padrão

de organização. Desta forma, é possível que esteja acontecendo algo semelhante em nossas culturas e a diminuição no número de neurônios se deva ao mau desenvolvimento da matriz extracelular.

Este resultado complementa estudos anteriores realizados em nosso laboratório, onde foi demonstrado que o microambiente formado por astrócitos cerebelares tratados com T<sub>3</sub> é melhor para o desenvolvimento de neurônios do que o de células não tratadas, já que este promove aumento na expressão e modifica a organização das moléculas de matriz extracelular, laminina e fibronectina (Trentin *et al* 2003). Adicionalmente, Mendes de Aguiar (2008) demonstrou que astrócitos hipotireóideos apresentaram redução da expressão de laminina e de fibronectina, em aproximadamente 25% para as duas proteínas, além de redução da área de distribuição das mesmas em 60% para fibronectina e 45% para laminina, quando comparados a astrócitos eutireóides. A literatura descreve a MEC como sendo fundamental para a migração, diferenciação e proliferação de células neurais, além ter ação na sinaptogênese, mielinização, crescimento e orientação axonais (Porterfield & Hendrich, 1993; Farwell & Dubord-Tomasetti, 1999; Koibuchi & Chin, 2000; Martinez & Gomes, 2002; Trentin *et al.*, 2003; Martinez & Gomes, 2005). Desta forma, o menor número de neurônios encontrado nas co-culturas com astrócitos hipotireóideos pode ser relacionado à diminuição da expressão e distribuição de proteínas de MEC, como, por exemplo, laminina e fibronectina. Apesar disso, outras moléculas de MEC também estão envolvidas neste processo, como as proteoglicanas sindecanas. Estas moléculas têm sua expressão regulada pelo T<sub>3</sub>, efeito mediado pelo FGF<sub>2</sub>, já que servem de co-receptores para este fator, e os efeitos do hipotireoidismo na expressão destas moléculas no



desenvolvimento do SNC já foram bem descritos por Mendes de Aguiar e colaboradores (b) (2008).

O segundo grupo de experimentos foi realizado no intuito de verificar se o tratamento dos astrócitos hipotireóideos com o hormônio  $T_3$  recuperaria a condição eutireóidea dos neurônios e em qual concentração do hormônio isto ocorreria. Estas co-culturas foram realizadas sobre culturas primárias de astrócitos mantidas durante os cinco dias de tratamento com meio de cultura sem SBF, o que pode explicar a queda no desenvolvimento neuronal observada no controle. Por outro lado, as co-culturas de astrócitos-neurônios normais ou hipotireóideos, sem o tratamento com  $T_3$ , são mantidas ao longo de todo o tempo de cultura na presença de SBF. O fato do SBF não ter sido utilizado durante o tratamento se deve ao fato de que ele contém consideráveis quantidades dos hormônios tireoidianos (revisado em Dezone *et al.*, 2009), o que influenciaria no resultado. Portanto, as diferenças no número de neurônios encontrados nestes dois tipos de co-culturas podem ser explicadas pelas diferenças nos protocolos.

Apesar do aumento no crescimento neuronal ter sido mais pronunciado nas maiores concentrações do hormônio, mesmo a condição de tratamento com 0,5 nM de  $T_3$  já foi suficiente para que o aumento no número de neurônios fosse significativo em relação ao controle, e este resultado pode ser explicado pelas concentrações de  $T_3$  utilizadas serem semelhantes às encontradas no plasma dos mamíferos (cerca de 0,9 a 2,8 nM) (Davies *et al.*, 2002).

Como já foi discutido anteriormente, a quantidade de moléculas secretadas pelos astrócitos é muito grande, indo muito além da secreção de fatores de crescimento como o FGF e o NGF. Os astrócitos também secretam moléculas de matriz extracelular como laminina, fibronectina e proteoglicanas, moléculas de adesão celular e até

neurotransmissores, como o glutamato (Dow & Wang, 1998). O tratamento de astrócitos hipotireóideos com T<sub>3</sub> promoveu aumento na imunorreatividade e na área de distribuição de laminina e fibronectina nestas culturas (Mendes de Aguiar, 2008), o que pode explicar o aumento progressivo do número de neurônios ao longo da curva de tratamento de T<sub>3</sub> (0,5, 1 e 10 nM) no presente trabalho. Desta forma, o papel do astrócito como célula provedora de moléculas sinalizadoras é indiscutível.

Apesar disso, o fato dos astrócitos estabelecerem contatos célula-célula através de junções *gap* evidenciou uma necessidade de estabelecer se o papel da astroglia no crescimento neuronal devia-se apenas aos produtos secretados ou se os contatos neurônios-astrócitos também contribuem para este processo, já que este tipo de contato se mostrou importante em outros modelos (revisado em Martinez & Gomes, 2005). Para isto, foram feitos experimentos onde os neurônios eram cultivados diretamente sobre poli-ornitina e mantidos por 24 horas em meio condicionado por astrócitos hipotireóideos tratados com T<sub>3</sub>. Todas as condições foram pobres em neurônios, apresentando número de células muito inferior ao encontrado quando estes eram cultivados sobre uma monocamada de astrócitos. Mesmo assim, a importância dos fatores secretados pelos astrócitos não pode ser descartada, já que todas as culturas que receberam meio condicionado tratado com T<sub>3</sub> apresentaram aumento no crescimento neuronal significativo em relação às culturas neuronais que receberam o meio condicionado por astrócitos hipotireóideos sem o mesmo tratamento. Em trabalhos anteriores realizados por nós e outros autores, foi demonstrado que T<sub>3</sub> induz astrócitos cerebelares a secretar uma combinação de fatores de crescimento, incluindo FGF<sub>2</sub> (Trentin *et al.*, 2001) e EGF (Gomes *et al.*, 1999; Martinez & Gomes, 2002). Além disso, Mendes de Aguiar e colaboradores (a) (2008) demonstraram que o tratamento com T<sub>3</sub> afeta diretamente a captação de glutamato, através do aumento dos

transportadores de glutamato GLAST e GLT-1. Este transporte de glutamato não é só importante para manter os níveis extracelulares do neurotransmissor em concentrações fisiológicas, mas também é necessário para a produção de energia destas células e para a síntese de glutathione, um tripeptídeo com funções antioxidantes essenciais para o SNC. (Mendes de Aguiar, 2008)

No presente trabalho, mesmo a menor concentração de  $T_3$  foi capaz de aumentar em quatro vezes o número de neurônios por campo, em comparação ao controle. Este valor corresponde ao dobro do aumento visualizado no experimento das co-culturas tratadas com  $T_3$ , mostrando que os fatores de crescimento presentes no meio condicionado atuam na manutenção do número celular. Apesar disto, o número absoluto de neurônios foi muito maior em co-cultura, em relação ao observado em cultura primária, apenas com o meio condicionado dos astrócitos. Estes resultados corroboram os encontrados em estudos similares, como o realizado por Martinez (2005), que encontrou um aumento de 60% no número de neurônios quando estes eram cultivados sobre monocamada de astrócitos, em condições semelhantes de cultivo.

## 6. Conclusões

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que a melhor condição para o desenvolvimento neuronal a secreção de fatores pelos astrócitos em resposta ao hormônio tireoidiano. Assim sendo, monocamadas de astrócitos normais foram mais eficientes em manter o desenvolvimento de neurônios, tanto eutireóides quanto hipotireóides. Além disso, o contato glia-neurônio também se mostrou fundamental para o crescimento neuronal, já que o crescimento neuronal foi drasticamente reduzido em culturas primárias de neurônios. Com relação ao tratamento com  $T_3$ , este se mostrou capaz de reverter a deficiência no crescimento neuronal causada pelo hipotireoidismo e que a concentração requerida para isto não é necessariamente superior à fisiológica. Portanto, o hormônio da tireóide influencia o desenvolvimento neuronal por diferentes mecanismos, como contato célula-célula e célula-matriz extracelular e através de fatores de crescimento solúveis.

## 7. Referências

1. AHMED, O.M; EL-GAREIB, A.W; EL-BAKRY, A.M; EL-TAWAB, S.M.A; AHMED, R.G. Thyroid hormones states and brain development interactions. *Int. J. Dev. Neurosci*, 10.10-16, 2007.
2. ANDERSON, C.M.; BRIDGES, J.R.; CHAMBERLIN, R.A.; SHIMAMOTO, K.; YASUDA-KAMATANI, Y.; SWANSON, R.A. Differing effects of substrate and non-substrate transport inhibitors on glutamate uptake reversal. *J Neurochem* 79:1207-1216, 2001.
3. BERNAL, J.; MORTE, B.; CUADRADO, M.; MANZANO, J. Influence of Thyroid Hormone and Thyroid Hormone Receptors in the Generation of Cerebellar  $\gamma$ -Aminobutyric Acid-Ergic Interneurons from Precursor Cells. *Endocrinology*, 148 (12): 5746-5751, 2007.
4. BIANCO, A.C.; SALVATORE, D.; GEREBEN, B.; BERRY, M.J.; LARSEN, P.R. Biochemistry, cellular and molecular biology and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr. Rev.* 23:38–89, 2002.
5. BIANCO, A.C.; KIM, B.W. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J Clin Invest* 116(10):2571-9, 2006.
6. BIGNAMI, A. & DAHL, D. Glial cells in the central nervous system and their reaction to injury. *Austin: Landes*. 109 p., 1994.
7. BONDAN, E.F ; LALLO, M.A ; DAGLI, M.L.Z ; GRAÇA, D.L. Estudo da imunorreatividade astrocitária para GFAP e vimentina no tronco encefálico de ratos Wistar submetidos ao modelo gliotóxico do brometo de etídio. *Arquivos de Neuropsiquiatria*, v. 61, n. 3-A, p. 642-649, 2003.

8. DAVIES, A.; BLAKELEY, A.G.H.; KIDD, C. *Fisiologia Humana*. 1 ed. Porto Alegre: ARTMED Editora S.A, 2002.
9. DEZONNE, R.S.; STIPURSKY, J.; GOMES, F.C.A. Effect of thyroid hormone depletion on cultured murine cerebral cortex astrocytes. *J. Neu Let*, 467(2), 58-62, 2009
10. DOW, K.E.; WANG, W. Cell biology of astrocyte proteoglycans. *Cell Mol Life Sci* 54:567-581, 1998.
11. FARWELL, A.P.; DUBORD-TOMASETTI, S. Thyroid hormone regulates the extracellular organization of laminin on astrocytes. *Endocrinoly*, 140:5014-5021, 1999.
12. FARWELL, A.P.; DUBORD-TOMASETTI, S.; PIETRZYKOWSKIA, A.Z; STACHELEKB, J.S; LEONARD, J.L. Regulation of cerebellar neuronal migration and neurite outgrowth by thyroxine and 3,3V,5V-triiodothyronine. *J.dev brain res* , 154 :121– 135, 2005.
13. FARWELL, A.P.; DUBORD-TOMASETTI, S.; PIETRZYKOWSKIA, A.Z; STACHELEKB, J.S; LEONARD, J.L. Dynamic nongenic actions of thyroid hormon in the developing rat brain. *Endocrinology*, 147(5):2567-2574, 2006.
14. FIELDS, R.D.; STEVEN-GRAHAM, B. Neuroscience - New insights into neuron-glia communication. *Sci* 298:556-562, 2002.
15. GARCIA-SEGURA, L.M.; CHOWEN, J.A.; NAFTOLIN, F. Endocrine glia: roles of glial cells in the brain actions of steroid and thyroid hormones and in the regulation of hormone secretion. *Front Neuroendocrinol* 17:180-211, 1996.
16. GILBERT, S.F. *Developmental Biology*. 8 ed., Sinauer Associates Inc., 2006.

17. GOMES, F.C.A.; MAIA, C.G.; MENEZES, J.R.L. de; MOURA NETO, V.  
(Cerebellar astrocytes treated by thyroid hormone modulate neuronal proliferation.  
*Glia* **25**:247-255, 1999
18. GUYTON, A.C. & HALL, J.E. Tratado de Fisiologia Médica. 10 ed., Guanabara  
Koogan, 2002.
19. JAMESON, J. & DEGROOT, L. Mechanisms of thyroid hormone action. *Journal  
of Endocrinology*. v.3, p. 538-601, 1994.
20. KOIBUCHI, N.; CHIN, W.W. Thyroid hormone action and brain development.  
*Trends Endocrinol Metab* 11(4):123-128, 2000.
21. LAMING, P.R.; KIMELBERG, H.; ROBINSON, S.; SALM, A.; HAWRYLAK, N.;  
MÜLLER, C.; ROOTS, B.; NG, K. Neuronal-glial interactions and behaviour.  
*Neurosci Biobehav Rev* 24:3:295-340, 2000.
22. LIMA, F.R.; GERVAIS, A.; COLIN, C.; IZEMBART, M.; NETO, V.M.;  
MALLAT, M. (2001). Regulation of microglial development: a novel role for  
thyroid hormone. *J Neurosci* 21(6):2028-38, 2001.
23. MARAGAKIS, N.J.; ROTHSTEIN, J.D. Mechanisms of disease: astrocytes in  
neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol* 2(12):679-89, 2006.
24. MARTINEZ, R.; GOMES, F.C.A. Neuritogenesis induced by thyroid hormone-  
treated astrocytes is mediated by epidermal growth factor/mitogen-activated protein  
kinase-phosphatidylinositol 3-kinase pathways and involves modulation of  
extracellular matrix proteins. *J Biol Chem* 277 49311-49318, 2002.
25. MARTINEZ, R.; GOMES, F.C.A. Proliferation of cerebellar neurons induced by  
astrocytes treated with thyroid hormone is mediated by a cooperation between cell

- contact and soluble factors and involves the epidermal growth factor-protein kinase A pathway. *J Neurosci Res* 80:341-349, 2005.
26. MENDES DE AGUIAR, C.B.N. Astrócitos e hormônio da tireóide (T<sub>3</sub>): Desenvolvimento neural e neuroproteção. 128 f. Tese de doutorado em Neurociências – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.
  27. MENDES DE AGUIAR, C.B.N.; ALCHINI, R.; DECKER, H. ALVAREZ-SILVA, M.; TASCA, C.I.; TRENTIN, A.G. (a) Thyroid Hormone increases astrocytic glutamate uptake and protects astrocytes and neurons against glutamate toxicity. *J Neurosci Res* 86:3117–3125, 2008.
  28. MENDES DE AGUIAR, C.B.N.; COSTA-SILVA, B.; ALVAREZ-SILVA, M.; TASCA, C.I.; TRENTIN, A.G. (b) Thyroid Hormone mediates syndecan expression in rat neonatal cerebellum. *Cell Mol Neurobiol* (6):795-801, 2008.
  29. MICHAEL, D.; NOREMBERG, M.D. Astrocyte Responses to CNS Injury. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, v. 53, n. 3, p. 213-220, 1994.
  30. MONTGOMERY, D.L. Astrocytes: form, functions and roles in diseases. *Veterinary Pathology*, v. 31, p. 145-167, 1994.
  31. MORTE, B.; MANZANO, J.; SCANLAN, T.S.; VENNSTROM, B.; BERNAL, J. Aberrant maturation of astrocytes in thyroid hormone receptor alpha 1 knockout mice reveals an interplay between thyroid hormone receptor isoforms. *Endocrinology* 145:386-1391, 2004.
  32. PETERS, A.; PALAY, S.L. & WEBSTER, H.F. The fine structure of the nervous system. 3 ed. New York: Oxford University Press. 494 p, 1991.



33. PORCINATTO, M.A. The extracellular matrix provides directional cues for neuronal migration during cerebellar development. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 39, p. 313-320, 2006
34. PORTERFIELD, S.P.; HENDRICH, C.E. The role of thyroid hormone in prenatal and neonatal neurological development-current perspectives. *Endocr Rev* 14:94-106, 1993.
35. RAFF, M.C. Glial cell diversification in the rat optic nerve. *Science*, v. 243, p. 1450-1455, 1989.
36. RANSOM, B.; BEHAR, T.; NEDERGAARD, M. New roles for astrocytes (stars at last). *Trends in Neuroscience*, v. 26, n. 10, p. 520-522, 2003.
37. RIENSTRA, D. Medicine for People. Newsletter of Monroe Street Medical Clinic. Disponível em: <<http://www.rienstraclinic.com/newsletter/2006/2006Jul.html>>. Acesso em: 30 de outubro de 2009.
38. SALLIS, E.S.V. Resposta astrocitária e oligodendroglial no tronco encefálico de ratos Wistar imunossuprimidos e submetidos ao modelo desmielinizante no brometo de etídio. 2005. 87 p. Tese de doutorado em Medicina Veterinária – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
39. SUMMERS, B.A.; CUMMINGS, J.F.; DE LAHUNTA, A. Principles of neuropathology. Baltimore: Mosby, 1995, 527p., p. 10-30.
40. TRENTIN, A.G.; ALVAREZ-SILVA, M.; MOURA NETO, V. Thyroid hormone induces cerebellar astrocytes and C6 glioma cells to secrete mitogenic growth factors. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281:1088-1094, 2001.

41. TRENTIN, A.G., MENDES DE AGUIAR, C.B.N., GARCEZ RC & ALVAREZ-SILVA, M. Thyroid hormone modulates the extracellular matrix organization and expression in cerebellar astrocyte: effects on astrocyte adhesion. *Glia*, v. 42, p. 359–369, 2003.
42. TRENTIN, A.G. Thyroid hormone and astrocyte morphogenesis. *Journal of Endocrinology* . v. 189, p. 189–197, 2006.
43. TSACOPOULOS, M.; MAGISTRETTI, P.J. Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci* 16(3):877-85, 1996.
44. WAXMAN, S.G.; BLACK, J.A. Freeze-fracture ultrastructure of the perinodal astrocyte and associated glial junctions. *Brain Res.* 308:1 77-87, 1984.
45. WINGATE, R.J.T. The rhombic lip and early cerebellar development. *Current Opinion in Neurobiology*. v.11, p. 82-88, 2001.